



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Determinación de la toxicidad del dimetilsulfóxido (DMSO) en distintas concentraciones sobre los alevines de truchas arco iris

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Brandon Alonso ZEÑA CARRASCO

ASESOR

Mg. Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Zeña B. Determinación de la toxicidad del dimetilsulfóxido (DMSO) en distintas concentraciones sobre los alevines de truchas arco iris [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2021.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Brandon Alonso Zeña Carrasco.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72885211
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6064-7311
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Alberto Gustavo Manchego Sayán
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15619652
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8199-0418
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Pedro Angulo Herrera
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08517424
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Guadalupe Victoria Contreras Salazar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07244311
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Rosa Amelia Perales Camacho
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	29595704

Datos de investigación	
Línea de Investigación	Histología, Embriología, Ictiopatología y Patología Veterinaria
Grupo de investigación	Grupo de investigación en sanidad acuícola “GRISANAC”
Agencia de financiamiento	INNOVATE PERÚ, proyecto N° 078–IAPIP-2017
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Calle: Av. Circunvalación 2800 Latitud: -12.0817189 Longitud: -76.9898964
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Junio – agosto 2019
URL de disciplinas OCDE	Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07 Ciencia Veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 30/09/2021

HORA INICIO: 12:00 horas

HORA TÉRMINO: 12.55

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: **Q.F. Dr. Angulo Herrera, Pedro**

MIEMBRO: **Blga. Contreras Salazar, Guadalupe Victoria**

MIEMBRO: **MV. MSc. Perales Camacho, Rosa Amelia**

ASESOR **MV. Mg. Manchego Sayán, Alberto Gustavo**

3. DATOS DEL TESISISTA

APELLIDOS Y NOMBRES: **ZEÑA CARRASCO, BRANDON ALONSO**

CÓDIGO: 12080018.

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N° 013276-2019-R/UNMSM**

TÍTULO DE LA TESIS: **“DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL DIMETILSULFOXIDO (DMSO) EN
DISTINTAS CONCENTRACIONES SOBRE LOS ALEVINES DE TRUCHAS ARCO IRIS”**

4. RECOMENDACIONES

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

Enlace a la videollamada: <https://meet.google.com/ufx-tpfc-avm>

ID: ufx-tpfc-avm

Grabación archivada en: <https://drive.google.com/file/d/1a4-p8ZejOdFmNY4OUrZ9LxDelFZRuq1R/view?usp=sharing>

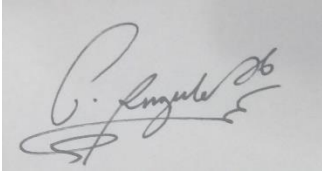
5. NOTA OBTENIDA: 17 (Diecisiete)

TESISTA	1	Brandon Zeña Carrasco	-	brandonzc.18@gmail.com
JURADO	2	Pedro Angulo Herrera	-	panguloh@unmsm.edu.pe
	3	Alberto Manchego Sayán	-	amanchegos@unmsm.edu.pe
	4	Guadalupe Contreras Salazar	-	gcontrerass@unmsm.edu.pe
	5	Rosa Perales Camacho	-	rperalesc@unmsm.edu.pe
MODERADOR	7	Luis Cerro Temoche	41341572	lcerrot@unmsm.edu.pe
COMITÉ DE SUSTENTACIONES	8	Luis Hoyos Sifuentes	41175479	luis.hoyos@unmsm.edu.pe
	9	Faride Altamirano Zevallos	43695598	faltamiranoz@unmsm.edu.pe
	10	Miryam Quevedo Urday	40064320	mquevedou@unmsm.edu.pe
	11	Víctor Hugo Castillo Doloriert	08703624	vcastillod@unmsm.edu.pe
SOLICITUD DE ASISTENCIA DOCENTES	12	Antonio Ampuero Bustillo	-	aampuerob@unmsm.edu.pe
	13	Sandra Bezada Quintana	-	sbezadaq@unmsm.edu.pe
	14	Carlos Amaringo	-	camaringoc@unmsm.edu.pe
	15	César Villanueva Chávez	-	cvillanuevac@unmsm.edu.pe
	16	Nieves Sandoval Chaupe	-	nsandovalc@unmsm.edu.pe
SOLICITUD DE ASISTENCIA ESTUDIANTES	17	María Nicole Lira Perez	72126888	marianicole.lira@unmsm.edu.pe
	18	Paola Estefania Alarcon Yalle	76294646	paola.alarcon@unmsm.edu.pe
	19	Andrea Alejandra Tavera	72786763	andrea.tavera@unmsm.edu.pe
	20	Jhonathan Arturo Bazalar	45165351	05080060@unmsm.edu.pe

6. PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)

INFORMÁTICA	21	Andrés Trujillo Peña	informatica.fmv@unmsm.edu.pe
-------------	----	----------------------	------------------------------

7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO


Q.F. Dr. Angulo Herrera, Pedro Apellidos y Nombres
PRESIDENTE

 <div> Firmado digitalmente por MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 11.10.2021 18:59:04 -05:00 </div>		 <div> Firmado digitalmente por PERALES CAMACHO Rosa Amelia FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 13.10.2021 13:28:41 -05:00 </div>
Firma	Firma	Firma
MV. Mg. Manchego Sayán, Alberto Gustavo Apellidos y Nombres	Blga. Contreras Salazar, Guadalupe Victoria Apellidos y Nombres	MV. MSc. Perales Camacho, Rosa Amelia Apellidos y Nombres
ASESOR DE LA TESIS	MIEMBRO JURADO	MIEMBRO JURADO

TABLA DE CONTENIDO

1	REVISION DE LA LITERATURA	9
1.1	SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA	9
1.1.1	Acuicultura a nivel mundial	9
1.1.2	Acuicultura en el Perú	10
1.2	Dimetilsulfóxido	11
1.3	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	13
1.4	Parámetros generales para el cultivo de truchas arco iris	14
2	MATERIALES Y MÉTODO	15
2.1	LUGAR Y FECHA DE ESTUDIO	15
2.2	METODOLOGÍA DE ESTUDIO	15
2.2.1	Animales de estudio	15
2.2.2	¡Error! Marcador no definido.	16
2.2.3	Distribución de grupos y estudio experimental	16
2.2.4	Análisis histológico	17
3	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	18
4	RESULTADOS 165 DISCUSIÓN 27246 CONCLUSIONES 287	
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 3229	

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales especies producidas en la acuicultura mundial (FAO, 2018).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la trucha arco iris.

Cuadro 3. Concentración y dosis de DMSO en peces experimentales.

Cuadro 4. Método Reed Muench.

Cuadro 5. Promedio (mediana) de scores para lesiones histológicas en hígado.

Cuadro 6. Cantidad de casos de lesiones histológicas para cada grupo en hígado.

Cuadro 7. Número de peces con lesiones histológicas en hígados de los grupos experimentales inoculados con distintas concentraciones de DMSO.

Cuadro 8. Promedio (mediana) de scores para lesiones histológicas en riñón.

Cuadro 9. Cantidad de casos de lesiones histológicas para cada grupo en riñón.

Cuadro 10. Número de peces con lesiones histológicas en riñones de los grupos experimentales inoculados con distintas concentraciones de DMSO.

Cuadro 11. Promedio (mediana) de scores para lesiones histológicas en riñón.

Cuadro 12. Número de peces con lesiones histológicas en intestino de los grupos experimentales inoculados con distintas concentraciones de DMSO.

RESUMEN

El dimetilsulfóxido (DMSO) es utilizado comúnmente como diluyente de compuestos hidrofóbicos como aceites esenciales o metabolitos de las vitaminas liposolubles, mucho de ellos utilizados como adyuvantes de vacunas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es determinar el grado de toxicidad del DMSO en alevines de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Para ello se inoculó por vía intraperitoneal a 180 alevines agrupados en 6 grupos de 30 peces con distintos porcentajes de DMSO (pureza 99.9%, M=78.13g/mol) en los grupos: G0= control, G1=0.1%, G2=1%, G3=10%, G4= 50% y G5= 100%. El volumen de inoculación fue de 0.1ml por alevín. Se observaron los signos clínicos y muertes de los peces inoculados por 7 días y se evaluó las lesiones histológicas de los muertos durante el periodo de observación y luego los sobrevivientes de todos los grupos fueron sacrificados para el estudio histológico de hígado, riñón e intestino para determinar las lesiones. Los peces de los grupos 1 al 4 (0.1% a 50%) no mostraron signos clínicos de enfermedades, pero los peces del grupo 5 (100%) mostraron oscurecimiento, nado errático, inapetencia y ascitis, muriendo todos a las 48 horas de inoculados. Los resultados histológicos determinaron leves lesiones histológicas de daño celular en hígado, riñón e intestino en bajas dosis, y a dosis de 100% causa severos daños celulares como necrosis e hiperplasias que se correlacionan con la sintomatología clínica de ascitis por daño renal. El DMSO es seguro a concentraciones iguales o menores del 10% y a altas concentraciones tienen efectos toxicológicos sobre el sistema excretor de los peces.

Palabras claves: Dimetilsulfóxido, alevines, trucha arco iris, toxicidad, histológico.

1. INTRODUCCION

En los últimos años hemos visto un crecimiento continuo de la acuicultura tanto en el interior del Perú (PRODUCE, 2013) como de forma global (PRODUCE, 2011). El consumo de pescado sigue aumentando por el alto porcentaje proteico que proporciona, siendo este mayor que el aporte proteico de carnes de aves, cerdos y vacunos. Nuestro medio es muy favorable para la crianza de variedades de peces debido a las aguas marinas y continentales, esto contribuye a que en el interior del país podamos seguir creciendo en esta producción y estudios asociados (PRODUCE, 2011).

Las facilidades de esta crianza conllevan a la aglomeración de esta especie en las piscigranjas y a la exigencia de aumentar la ganancia de peso e índices productivos en general, estas altas demandas originan una depresión del sistema inmune del pez, dejándolo susceptible a organismos patógenos y poniendo en riesgo no sólo la sanidad animal, sino también la economía del productor.

Lo mencionado anteriormente nos dirige directamente a enfocarnos en la sanidad acuícola, además de las exigencias de empresas y requisitos mínimos para la exportación de productos inocuos y de calidad. Siendo así que el DMSO que es tan utilizado en la industria sin tener un registro exacto de la toxicidad que podría tener en la especie en mención, se vuelve un compuesto interesante en investigación.

El dimetilsulfóxido (DMSO) es utilizado comúnmente como diluyente de compuestos hidrofóbicos como aceites esenciales o metabolitos de las vitaminas liposolubles, mucho de ellos utilizados como adyuvantes en vacunas. (Gaylord Chemical Company, L.L.C, 2014). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es determinar el grado de toxicidad del DMSO en alevines de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

2. REVISION DE LA LITERATURA

2.1 Situación actual de la acuicultura

2.1.1 Acuicultura a nivel mundial

A nivel mundial se puede ver que la acuicultura ha alcanzado grandes avances en el sector comercial, esto se debe a la tecnificación en los sistemas de crianza y a la ampliación de especies para este cultivo. En el 2016, aproximadamente el 35% de la producción pesquera mundial ingresó al comercio internacional tanto para consumo humano como para fines no comestibles. (FAO, 2018).

Sesenta millones de toneladas de pescado y productos pesqueros totales exportados en el 2016 representaron un incremento del 245% en comparación con 1976; esto quiere decir que en un período de 40 años 1976-2016 las exportaciones se incrementaron de 8 000 millones de USD a 143 000 millones de USD, siendo más significativo en los países en desarrollo que en los países ya desarrollados. (FAO, 2018).

Existe una gran variedad de especies obtenidas, sin embargo, el mayor volumen de la producción está dominada en los planos nacional, regional y mundial por un pequeño grupo de especies, la cría de peces de aleta, constituyen el subsector más diverso, más del 90% de la producción total en el 2016, siendo de gran importancia entre estos la trucha arco iris (Cuadro 1) (FAO, 2018).

Cuadro 1. Principales especies producidas en la acuicultura mundial (FAO, 2018).

Partida de especies	2010	2012	2014	2016	% Total 2016
Peces de aleta					
Carpa herbívora, <i>Ctenopharyngo-don idellus</i>	4 362	5 018	5 539	6 068	11
Carpa plateada, <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	4 100	4 193	4 968	5 301	10
Carpa común, <i>Cyprinus carpio</i>	3 421	3 753	4 161	4 557	8
Tilapia del Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	2 537	3 260	3 677	4 200	8
Carpa cabezona, <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	2 587	2 901	3 255	3 527	7
<i>Carassius</i> spp.	2 216	2 451	2 769	3 006	6
Catla, <i>Catla catla</i>	2 977	2 761	2 770	2 961	6
Peces de agua dulce <i>nep</i> , <i>Osteichthyes</i>	1 378	1 942	2 063	2 362	4
Salmón del Atlántico, <i>Salmo salar</i>	1 437	2 074	2 348	2 248	4
Labeo Roho, <i>Labeo rohita</i>	1 133	1 566	1 670	1 843	3
<i>Pangasius</i> spp.	1 307	1 575	1 616	1 741	3

Chano, <i>Chanos_chanos</i>	809	943	1 041	1 188	2
Tilapias nep, <i>Oreochromis</i> spp.	628	876	1 163	1 177	2
<i>Clarias</i> spp.	353	554	809	979	2
Peces marinos nep, <i>Osteichthyes</i>	477	585	684	844	2
Carpa de Wuchang, <i>Megalobrama amblycephala</i>	652	706	783	826	2
Trucha arco iris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	752	883	796	814	2
Ciprínidos nep, <i>Cyprinidae</i>	719	620	724	670	1
<i>Carpa negra</i> , <i>Mylopharyngodon piceus</i>	424	495	557	632	1
Cabeza de serpiente, <i>Channa_argus</i>	377	481	511	518	1
Otros peces de aleta	5 849	6 815	7 774	8 629	16
Total de peces de aleta	38 494	44 453	49 679	54 091	100

Es una realidad que el incremento en la comercialización de especies marinas se debe a la apertura de nuevos mercados a nivel mundial y a la inserción de nuevas especies en la crianza comercial (tanto marina como continental); de igual modo, los aspectos de la globalización y los acuerdos comerciales vienen jugando un papel importante en la integración y dinamismo de los mercados y en el requerimiento de productos con mayor valor agregado, inocuos y de alta calidad. Por otro lado, uno de los aspectos de imperativa importancia en la comercialización de productos acuícolas es el fortalecimiento de las medidas de bioseguridad e inocuidad de alimentos en todos sus niveles, así como los aspectos relacionados al respeto ambiental y la inocuidad de productos (PRODUCE, 2011).

2.1.2 Acuicultura en el Perú

El 2016 finalizó con US\$ 888 Millones con respecto al mercado mundial de importación de trucha arco iris, esto es una expansión del 6.6% con respecto al 2015; ubicando al Perú durante este período como el 5to productor de trucha arco iris participando en un 2.2% como productor a nivel mundial (Trademap, 2018).

En relación a la acuicultura nacional, para el año 2013 la producción alcanzó más de 125'693 mil toneladas, 68% proveniente del ámbito marino y 32% proveniente del ámbito continental. Gran parte de este crecimiento productivo se debe a especies cultivadas como las conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*), langostino o camarones peneidos (*Litopenaneus vannamei*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). La producción de tilapias y peces amazónicos también crecieron durante este período (PRODUCE, 2013). Los niveles de cosecha acuícola según su nivel de desarrollo están

sustentados en empresas de menor escala a o de pequeña y mediana empresa y las asociaciones que desarrollan actividades de repoblamiento las cuales en conjunto tienen una participación de 63.14%, el nivel de acuicultura de mayor escala tiene una participación de 36.22% y la acuicultura de subsistencia o de recursos limitados tendrían una participación de apenas 0.64%.

Actualmente existen departamentos que vienen convirtiéndose en principales zonas de producción del país. Por ejemplo, Tumbes se caracteriza por la crianza de langostinos (*Litopenaneus vannamei*), Piura y Ancash por las conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*), San Martín y Piura por la crianza de tilapias (*Oreochromis spp.*) y Junín, Huancavelica, Lima, Pasco y Puno se caracterizan por la crianza de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). (PRODUCE, 2011).

2.2 Dimetilsulfóxido

El Dimetilsulfóxido (DMSO) es un solvente aprótico dipolar fabricado comercialmente, pero también es una sustancia natural. Aparentemente es parte del complejo ciclo del azufre de la Tierra. El DMSO se crea en la atmósfera a una tasa de 20-60 mil millones de libras anuales por sulfuro de dimetilo, que se produce por procesos metabólicos en el suelo y los sedimentos. El DMSO también se encuentra en aguas naturales y suelos. El metabolismo de DMSO en el suelo por microorganismos da como resultado la formación de azufre y sulfuro de dimetilo, también se informa que el DMSO está presente en bajas concentraciones (<0.05-3.7 ppm) en productos alimenticios como chucrut, pasta de tomate, leche, cerveza, café, té y en cultivos forrajeros como alfalfa y ensilaje de maíz. (Gaylord Chemical Company, L.L.C, 2014).

DMSO tiene baja toxicidad aguda y crónica para la vida animal, vegetal y acuática. La exposición a organismos de prueba a altas concentraciones por contacto, ingestión o inhalación muestra constantemente baja toxicidad. DMSO no figura en la lista de agentes cancerígenos según las autoridades reguladoras y en realidad se usa como disolvente neutro en las pruebas de mutagenicidad de Ames. El DMSO se usa con frecuencia como solvente portador en experimentos toxicológicos debido a su toxicidad excepcionalmente baja y su impacto ambiental y también para lograr una dispersión más efectiva de los tóxicos. Los estudios de toxicidad acuática de DMSO sobre las frecuencias respiratorias y los componentes bioquímicos del músculo y el hígado en catla revelaron una letalidad mínima y un efecto insignificante en la fisiología del organismo de prueba (Omprakasam, 2008).

En los años 70 se hicieron pruebas de toxicidad con tritones, a quienes se les inyectó DMSO intraperitoneal y a otros se les sumergió en agua, determinando que los tritones inyectados con menos 20g/kg de peso vivo y los sumergidos en concentraciones menores del 3% se recuperaron dentro de las 24 a 72 horas, incluso siendo indiferenciables con el grupo control, a pesar de presentar signos clínicos a partir de dosis de 15g/kg y concentraciones superiores al 2%. (Lapemmbush, 1971).

En 1978, La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) aprobó el uso de DMSO en una mezcla 50/50 con agua como un tratamiento eficaz para los síntomas de la cistitis intersticial. Desde entonces, un gran número de personas han recibido este tratamiento. El producto es comercializado hoy por Edwards Life Sciences bajo el nombre comercial de Rimso-50 (Gaylord Chemical Company, L.L.C, 2007).

En el 2011, un estudio de la Universidad CEU Cardenal Herrera reveló la eficacia del uso local del DMSO para aliviar los procesos inflamatorios en el síndrome de dolor regional complejo tipo 1, utilizando un porcentaje del 50%. (Gaspar, 2011).

Estudios anteriores en roedores demostraron que administrar DMSO podría provocar efectos neurotóxicos en el sistema nervioso periférico, como reducir velocidad de conducción nerviosa o histopatología (Cavaletti *et al.*, 2000). La administración intraperitoneal de 32 y 64-% de DMSO disminuyó significativamente la actividad locomotora de los ratones (Castro *et al.*, 1995). Sin embargo, se observaron déficits no motores en ratas tratadas a dosis del 1.8 – 7.2% por la misma vía de administración (Authier *et al.*, 2002). En un estudio que utilizó gusanos planarios (*Dugesia* sp.) como animales de experimento, la exposición acuosa de DMSO en concentración de 0.5 a 10% durante 8 minutos disminuyó la motilidad de los gusanos de una manera proporcional a la concentración (Pagán *et al.*, 2006). En comparación con estos estudios, se observó hiperactividad en larvas de pez cebra expuestas a DMSO al 0.01 – 1%. Esta disimilitud puede contribuir a la diferencia entre especies y/o las concentraciones mucho más bajas que se usó en el estudio en Taiwan (Te Hao Chen *et al.*, 2011).

El DMSO ha sido utilizado como analgésico local para aliviar el dolor musculoesquelético (Evans *et al.*, 1993). Por lo tanto, el aumento de esta actividad y las trayectorias menos tortuosas en los peces expuestos al DMSO también pueden resultar de la pérdida del equilibrio bajo anestesia ligera. Es importante resaltar que se informó de hiperactividad asociada a la respuesta ansiolítica en peces cebra adultos expuestos a DMSO al 0.05% y etanol al 0.5% durante 3-4 minutos (Sackerman *et al.*, 2010).

Además, (Carolsfeld *et al.*, 2003) demostró que el DMSO es un sulfóxido con propiedades ventajosas para su uso en la crioconservación. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que otros crioprotectores internos, como el metilglicol, son superiores al DMSO (Viveiros *et al.*, 2009). La tasa más alta de motilidad se logró numéricamente al 5% de DMSO, pero este hallazgo no fue estadísticamente significativo. Así, los resultados, además de las observaciones de Miliorini *et al.*

(2011), indican que el DMSO es adecuado para la criopreservación del semen de Curimba (Varela *et al.*, 2005).

La capacidad de un crioprotector para penetrar en una célula influye en su capacidad de crioprotección interna (Miliorini, 2006). Sin embargo, una cantidad excesiva de crioprotector que penetra en la célula puede provocar toxicidad en los espermatozoides. Estos efectos tóxicos sobre el semen de los peces se han observado anteriormente, especialmente cuando se utilizan crioprotectores en altas concentraciones (Leung, 1991). Por tanto, se puede suponer que el DMSO al 5% es menos tóxico que el DMSO al 11%. Este último causó mortalidad y daño a células más sensibles, lo que mermó su potencial de fertilización. Otra razón para la mejora de las tasas de fertilización y eclosión al 5% de DMSO es que esta fusión habría proporcionado mayores tiempos de latencia de los espermatozoides después de la descongelación (Varela *et al.*, 2005).

2.3 Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

La trucha arco iris es originaria de América del Norte, pertenece al grupo de los salmónidos, su nombre proviene de la coloración peculiar que posee, esta coloración puede cambiar en función al medio, a la talla, al sexo, a la alimentación, incluso al grado de maduración sexual.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la trucha arco iris (Smith, 1989).

Reino	Animal
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Pisces
Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinopterygii
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Género	Oncorhynchus
Especie	mykiss
Nombre científico	Oncorhynchus mykiss
Nombre común	Trucha arco iris

Para establecer un criadero de truchas arco iris hay diversas consideraciones a tener para asemejarlo lo más posible a su ambiente natural. La trucha arco iris de manera natural habita aguas cristalinas y puras con cauces que generan desniveles topográficos que originan cascadas, saltos y rápidos, además de suelos pedregosos que se suelen encontrar en los ríos de alta montaña. La sierra alta suele ser una zona de buena crianza por sus aguas frías, claras y bien oxigenadas. (FAO, 2009).

En cuanto a su alimentación es una especie carnívora que suele alimentarse de las presas vivas que puede capturar, acuáticas y algunas terrestres como insectos que en primavera y verano suelen acercarse al agua, otras presas fáciles pueden ser moluscos como caracoles, crustáceos, gusanos, renacuajos y sobre todo peces más pequeños que pueden ser incluso de la misma especie. (Aquino, 2008).

2.4 Parámetros generales para el cultivo de truchas arco iris.

Es fundamental asegurar la calidad del agua a utilizar en el criadero ya que esto asegurará el correcto desarrollo de la especie, debemos regular parámetros como turbidez, pH, temperatura, oxígeno y amonio para obtener las características esperadas. (Aquino, 2008).

El cultivo de la trucha arco iris requiere gran cantidad de oxígeno en el agua, siendo más exigentes los huevos y los alevines con una demanda de 6 a 7 mg/l, mientras que los que están en crecimiento requieren de 5 a 5.5 mg/l. Es importante considerar que las truchas presentan dificultades para captar este oxígeno y transportarlo a través de sus branquias. (Aquino, 2008).

Los peces en general no cuentan con capacidad de termorregulación corporal así que dependen del medio acuático en el que viven. Esta temperatura tiene influencia directa sobre el ritmo de crecimiento, aspectos reproductivos y principalmente sobre el grado de actividad metabólica.

En su hábitat natural suelen desarrollarse adecuadamente en aguas con temperaturas entre 0° y 25°C, sin embargo, en la crianza artificial esto cambia, para obtener un crecimiento y desarrollo adecuado deben estar a temperaturas entre 9° y 17°C, incluso mientras están en etapa de alevín a temperaturas de 10°-12°C. (Aquino, 2008).

El pH influye en el estrés de la especie, por lo tanto, en la reproducción de estos, pero más importante aún una mala regulación del pH podría ser mortal por demasiada acidez o estar muy alcalino, el rango adecuado del potencial de hidrógeno debería ser de 6.5 a 9. (Aquino, 2008).

La turbidez generalmente es causada por partículas arrastradas del suelo o vegetación adyacente, así como el plancton que disminuye la absorción de oxígeno por parte de las truchas arco iris, los alevines son los más susceptibles llegando hasta infecciones branquiales, irritaciones por la absorción de estas partículas suspendidas, en conclusión, la turbidez reduciría la tasa de crecimiento.

El amoníaco se encuentra como producto de las excreciones de los peces, por lo que es importante considerar el número de peces a criar en un estanque, por cada unidad de pH que aumenta el amoníaco

incrementa en 10 veces su producción, esto puede dañar las branquias y retardar el crecimiento. (Aquino, 2008).

3 MATERIALES Y MÉTODO

3.1 LUGAR Y FECHA DE ESTUDIO

El presente estudio fue realizado durante los meses de julio y agosto del 2019, en el área experimental del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Animal Sección Ictiopatología, y el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Animal Sección Inmunología.

3.2 METODOLOGÍA DE ESTUDIO

La metodología del presente estudio corresponde a un diseño de tipo experimental por grupos, que involucra la observación de signos clínicos y lesiones histológicas de los órganos en estudio causados por distintas concentraciones de DMSO inoculadas.

3.2.1 Animales de Estudio

Para calcular el número de animales se usó la fórmula de diferencia de proporciones:

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha} + Z_{\beta}}{p_1 - p_2} \right)^2 \times (p_1 q_1 + p_2 q_2)$$

Donde:

Z_{α} = valor de la tabla para el nivel de confianza especificado

Z_{β} = valor de la tabla para el poder especificado

p_1 = proporción en la población 1

p_2 = proporción en la población 2

$p_1 q_1$ = varianza de la proporción en la población 1 = $p_1(1-p_1)$

$p_2 q_2$ = varianza de la proporción en la población 2 = $p_2(1-p_2)$

En un estudio piloto, el grupo con mayor mortalidad fue DMSO al 100%. Este grupo tuvo 100% de mortalidad, mientras que los demás grupos tuvieron 0% de mortalidad. Teniendo en cuenta una confianza de 95% y un poder del 80% se obtuvo un total de 4 animales por grupo experimental.

Se decidió trabajar con un total de 30 animales por grupo para aumentar la precisión del estudio.

3.2.2 Descripción de especie en estudio

Alevines de trucha arco iris: 9 cm de talla promedio con descartes de no estar infectados de los principales agentes patógenos presentes en nuestro medio.

Descarte de bacterias: Para la *Flavobacterium psychrophilum*, se cultivó en Agar Cytophaga a 14°C por 5 días y para *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* se realizó cultivo bacteriano en caldo tripticasa soya a 25°C por 48 horas y se determinó la ausencia de las bacterias patógenas, las muestras fueron tomadas de riñón y bazo de 5 alevines de trucha arco iris seleccionados al azar previo al inicio del estudio.

Para una adecuada respuesta fue necesario tener a los especímenes sin ningún tipo de estrés que pueda inmuno-deprimirlos y a su vez alterar los resultados, por lo que se procede a un período de aclimatación de 15 días en los acuarios de crianza del centro de estudio (Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Animal Sección Ictiopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos).

3.2.3 Distribución de grupos y estudio experimental

Se formaron 6 grupos experimentales de 30 peces cada uno: con distintos porcentajes de DMSO (pureza 99.9%, M=78.13g/mol, Densidad: 1,101 g/cm³ (20 °C), J.T. Baker), de concentración en PBS (0.1M): Grupo Control, G1=0.1%, G2=1%, G3=10%, G4= 50% y G5= 100%. Cada grupo se criaron en un acuario con una temperatura de 14°C y con 8ppm de oxígeno disponible en agua. En cada grupo experimental se inoculó por vía intraperitoneal un volumen de 0.1 ml. de DMSO por alevín.

Se observaron los signos clínicos y muertes de los peces inoculados por 7 días, posteriormente, los muertos y sobrevivientes de todos los grupos fueron sacrificados y necropsiados para el estudio histopatológico. Se determinó la dosis letal 50 (DL50) por el método de Reed Muench.

Cuadro 3. Concentración y dosis de DMSO en peces experimentales

Grupo (n=30)	Proporción DMSO (%)	Concentración DMSO (g/ml)	Dosis de DMSO (g) /pez de 10g	Dosis de DMSO / kg de pez
G5	100	1.10	0.110g/pez	11g
G4	50	0.55	0.055	5.5g
G3	10	0.11	0.011	1.10g
G2	1	0.011	0.0011	0.11g
G1	0.1	0.0011	0.00011	0.011g
control	0	0	0	0

3.2.4 Análisis histológico

Los animales muertos y sacrificados fueron necropsiados y descritas las lesiones hitológicas.

Se tomaron muestras de hígado, riñón e intestino que fueron colocadas en una solución de formol al 10% para su fijación. Las muestras fueron procesadas bajo procesamiento convencional para obtención de láminas histológicas coloreadas con Hematoxilina Eosina (HE) para la lectura y determinar los grados de las lesiones histológicas, además se tomaron microfotografías durante la evaluación al microscopio Leica DM 750 con cámara digital incorporado ICC50 W y software de medición Las 4.12 Leica Macrosystems para su posterior exposición.

Las lesiones propias de cada órgano estudiado fueron tabuladas para establecer los grados de lesiones y de toxicidad del DMSO.

Se analizó hígado

Para degeneración se tuvo una escala del 0 al 6, donde 0 es ausente, 1 ligero hidrópico, 2 leve hidrópico, 3 degeneración grasa grado I, 4 degeneración grasa grado II, 5 degeneración grasa grado III, y 6 degeneración grasa grado IV. Para hiperplasia de canalículos biliares se tuvo una escala del 0 al 3, donde 0 es ausente; 1 leve, 2 moderada: y 3 severa. Para infiltración de linfocitos en periconductos se tuvo una escala del 0 al 2, donde 0 es ausente; 1 leve; y 2 moderada,

Se determinó la presencia o no de necrosis de células hepáticas y congestión severa de tejido.

Se analizó riñón

Para regeneración tubular, degeneración hidrópica e hiperplasia de túbulos, se tuvo una escala del 0 al 2, donde 0 es ausente, 1 leve, y 2 moderada.

Se determinó la presencia o no de melano macrófagos, necrosis tubular, y fluido en espacio de Bowman y atrofia glomerular.

Se analizó Intestino

Para hiperplasia de enterocitos y mucosa se tuvo una escala del 0 al 3, donde 0 es ausente; 1 leve; 2 moderada, y 3 severa.

4 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para determinar si existió algún tipo de dependencia entre los tratamientos y los grados de degeneración hepática, hiperplasia de canalículos biliares, infiltración de linfocitos pericaniculares en hígado, regeneración tubular en riñones, degeneración hidrópica renal, hiperplasia tubular en riñón e hiperplasia de enterocitos y mucosa a nivel intestinal se usó la prueba de Kruskal Wallis. Para determinar entre que grupos existió alguna diferencia, se utilizó la rutina de “Kwallis2” en el paquete estadístico STATA 11.

Para determinar si existió alguna asociación entre los grupos y la presencia de necrosis o congestión hepática, presencia de melano-macrófagos, necrosis tubular, fluido en el espacio de Bowman y atrofia glomerular se usó la prueba de Chi cuadrado, en el paquete estadístico STATA 11.

5 RESULTADOS

A.- SIGNOS CLÍNICOS

Los grupos de peces: 1 (0.1%), 2 (1%), 3 (10%) y 4 (50%) tuvieron un comportamiento normal y no mostraron signos clínicos de intoxicación durante el periodo de evaluación, sobreviviendo todos los peces el periodo de observación.

El grupo 5 (100% DMSO) obtuvo una mortalidad del 100% a las 48 horas de inoculado el DMSO, previamente, en forma progresiva, se observaron signos clínicos como: oscurecimiento del pez, nado errático, inapetencia y abultamiento del abdomen (asociado a ascitis).

Cuadro 4. Método Reed Muench:

Concentración	Total de muertos	Total de vivos	Acumulado de muertos	Acumulado de vivos	Relación	%
100.0	30	0	30	0	30/30	100
50.0	0	30	0	30	0/30	0
10.0	0	30	0	60	0/60	0
1.0	0	30	0	90	0/90	0
0.1	0	30	0	120	0/120	0
0	0	30	00	150	0/150	0

$$DP = 100 - 50/100 - 0 = 50/100 = 0.5$$

El método Reed Muench determinó una DL_{50} de 75% de DMSO con una concentración de 8.25g/kg de peso vivo.

B.- LESIONES HISTOLÓGICAS

Luego del periodo de observación se sacrificaron humanitariamente a los peces inoculados y se les realizó el análisis histopatológico de los hígados, riñón e intestino de todos los peces tratados y el grupo control. Los cortes de órganos de los peces del grupo control (G 6) mostraron estructuras normales a su especie, usándolas como patrón para describir las alteraciones histológicas de los peces tratados.

B.1. Hígados.

En los peces tratados, sus hígados muestran diferentes grados de lesiones celulares y de tejidos los cuales se van incrementando en número y grados de lesiones como se describen en el cuadro 7 y en las microfotografías.

En el cuadro 5 se observa los promedios en el score para degeneración, hiperplasia de canalículos biliares, infiltración de linfocitos en periconducto. En este cuadro se observa que no hubo diferencia estadística significativa para ninguna de las 3 variables entre los grupos 0 1 y 2, mientras que el grupo 4 y el grupo 5 fueron diferentes a todos los demás grupos incluso entre sí.

Cuadro 5.- Promedio (mediana) de scores para lesiones histológicas en hígado

HIGADO			
Grupo	Degeneración	Hiperplasia	Infiltración
0	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a
1	0.27(0) ^{ab}	0.33(0) ^{ab}	0(0) ^a
2	0.67(0) ^{ab}	0.33(0) ^{ab}	0.17(0) ^{ab}
3	1.47(0) ^b	0.6(0) ^b	0.4(0) ^b
4	3.67(5) ^c	1.6(2) ^c	1.4(0) ^c
5	5.8(6) ^d	2.8(3) ^d	0(0) ^a

a, ab, c, d Superíndices diferentes entre filas indican diferencia estadística significativa

Según el cuadro 6, se observa que sólo el grupo 5 presentó lesiones de necrosis de células hepáticas y congestión severa de tejido en todos los animales.

Cuadro 6.- Cantidad de casos de lesiones histológicas para cada grupo en hígado

HIGADO		
Grupo	Necrosis	Congestión
0	0 ^a	0 ^a
1	0 ^a	0 ^a
2	0 ^a	0 ^a
3	0 ^a	0 ^a
4	0 ^a	0 ^a
5	30 ^b	30 ^b

a, b Superíndices diferentes entre filas indican diferencia estadística significativa

Cuadro 7.- Número de peces con lesiones histopatológicas en hígados de los grupos experimentales inoculados con distintas concentraciones de DMSO.

G1 = 0.1% DMSO n=30	G2= 1% DMSO n=30	G3= 10% DMSO n=30	G4= 50% DMSO n=30	G5= 100% DMSO n=30
Ligera degeneración hidrópica (08/30). Leve hiperplasia de canalículo biliar (10/30)	Leve degeneración hidrópica (10/30). Hiperplasia leve de canalículo biliar (10/30). Leve infiltración de linfocitos pericanicular (5/30)	Degeneración grasa grado 2 (11/30). Hiperplasia moderada de canalículo biliar (9/30). Leve infiltración de linfocitos en periconducto (12/30)	Degeneración grasa grado 3 (22/30). Hiperplasia moderada de canalículo biliar (24/30). Moderada infiltración de linfocitos en periconducto (21/30)	Necrosis de células hepáticas 30/30). Hiperplasia severa de canalículos biliares 28/30). Congestión severa de tejido (30/30). Degeneración grasa tipo IV asociada a necrosis (29/30).

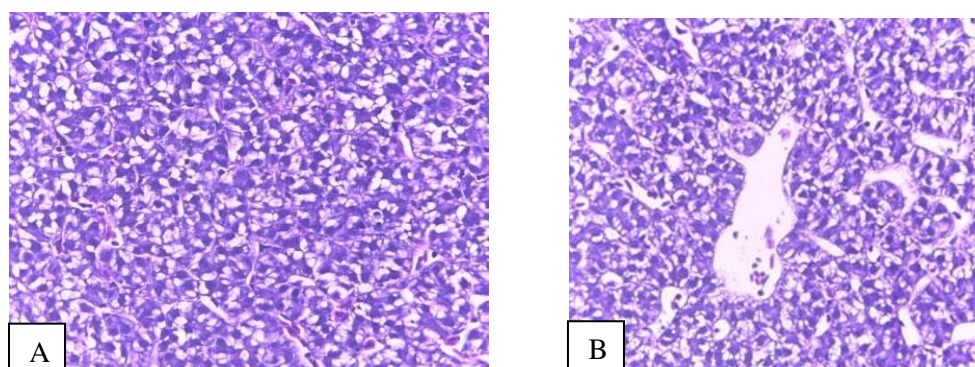


Foto 1.- Microfotografía de hígado de peces de grupo 1 (0.1% DMSO). Presencia de moderada degeneración hidrópica de hepatocitos (A). Presencia de ligera hiperplasia de canalículo biliar (B). HE, 40X

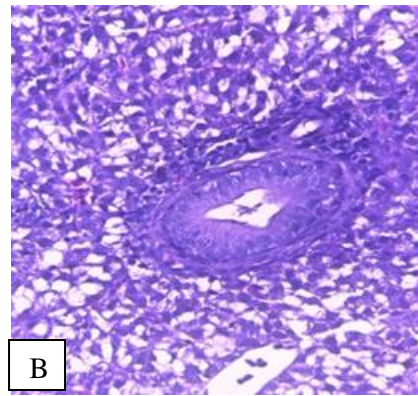
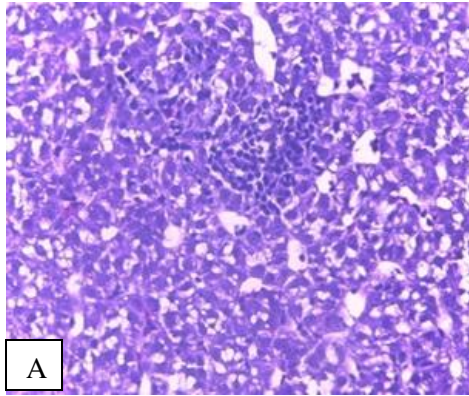


Foto 2.- Microfotografía de hígado de peces de grupo 2 (1% DMSO). Presencia de degeneración grasa de hepatocitos (A). Presencia de moderada hiperplasia de canalículo biliar (B). HE, 40X

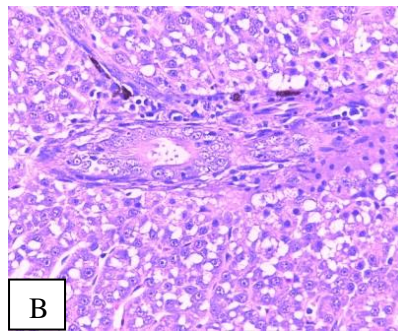
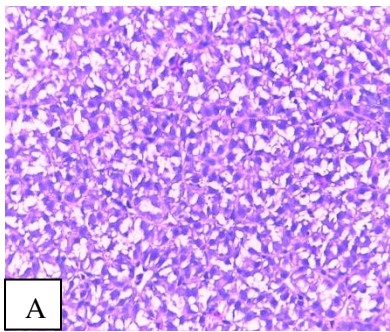


Foto 3.- Microfotografía de hígado de peces de grupo 3 (10% DMSO). Presencia de Degeneración grasa grado 2 de hepatocitos (A). Presencia de hiperplasia moderada de canalículo biliar con leve infiltración de linfocitos (B). HE, 40X

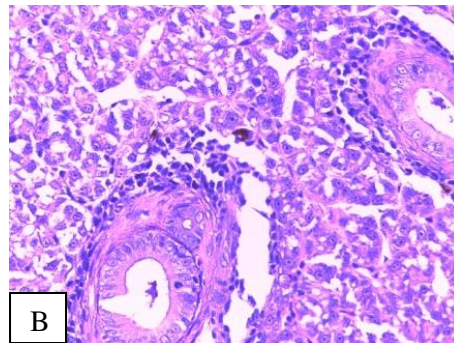
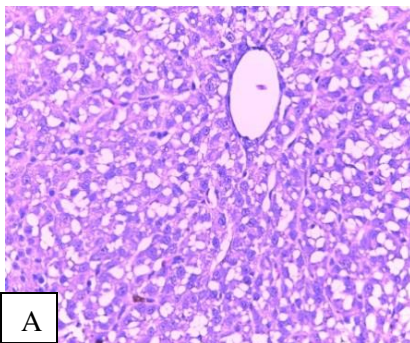


Foto 4.- Microfotografía de hígado de peces de grupo 4 (50% DMSO). Degeneración grasa grado 3 (A). Hiperplasia moderada de canalículo biliar (B). HE, 40X

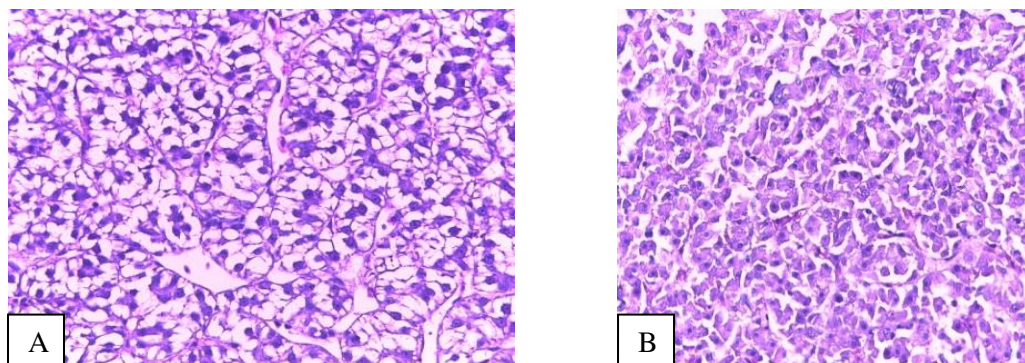


Foto 5.- Microfotografía de hígado de peces de grupo 5 (100% DMSO). Degeneración grasa tipo IV asociada a necrosis de células hepáticas (A) Hiperplasia severa de canalículos biliares (B). HE, 40X

B.2. Riñones.

En los peces tratados, los riñones muestran diferentes grados de lesiones celulares y de tejidos los cuales se van incrementando en número y grados de lesiones como se describen en el cuadro 10 y en las microfotografías de riñones procesados para láminas histológicas coloreadas con Hematoxilina-eosina. En el cuadro 8 se observa los promedios en el score para regeneración tubular, degeneración hidrópica, hiperplasia de túbulos con núcleos. En este cuadro se observa que no hubo diferencia estadística significativa para regeneración tubular entre los grupos 0, 1, 4 y 5, mientras que el grupo 3 fue diferente a los demás con excepción del grupo 2. Para degeneración hidrópica no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos 0 y 1, mientras que los grupos 3, 4 y 5 fueron diferentes a los grupos 0, 1 y 3, sin embargo, sin diferencia estadística significativa entre sí, Para hiperplasia de túbulos no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos 0, 1, 2 y 5, mientras que los grupos 3 y 4 fueron diferentes a todos los demás grupos, guardando similitud entre sí.

Cuadro 8.- Promedio (mediana) de scores para lesiones histológicas en riñón

RIÑÓN			
Grupo	Regeneración	Degeneración	Hiperplasia
0	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a
1	0.17(0) ^{ab}	0(0) ^a	0(0) ^a
2	0.6(0) ^{bc}	0.53(0) ^b	0.23(0) ^a
3	1.07(0) ^c	1.33(2) ^c	0.7(1) ^b
4	0(0) ^a	1.67(2) ^c	1.07(0) ^b
5	0(0) ^a	1.8(2) ^c	0(0) ^a

a, ab, bc, c Superíndices diferentes entre filas indican diferencia estadística significativa

Según el cuadro 9, se observa que sólo el grupo 4 presentó melano macrófagos, y sólo el grupo 5 lesiones de necrosis tubular y fluido en espacio de Bowman, en la totalidad de los animales y en 25 de ellos respectivamente.

Cuadro 9.- Cantidad de casos de lesiones histológicas para cada grupo en riñón

RIÑÓN			
Grupo	Melano macrófagos	Necrosis	Fluido en espacio Bowman
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
1	0 ^a	0 ^a	0 ^a
2	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	0 ^a	0 ^a	0 ^a
4	17 ^b	0 ^a	0 ^a
5	0 ^a	30 ^b	25 ^b

^{a, b} Superíndices diferentes entre filas indican diferencia estadística significativa

Cuadro 10. Número de peces con lesiones histológicas en Riñones de los grupos experimentales inoculados con distintas concentraciones de DMSO

G1=0.1% DMSO N=30	G2=1% DMSO N=30	G3= 10% DMSO N=30	G4=50% DMSO N=30	G5=100% DMSO N=30
Ligera regeneración tubular (5/30).	Moderada degeneración hidrópica (8/30). Hiperplasia de túbulos con núcleos hipertróficos (7/30). Regeneración tubular (9/30) Escasos melano – macrófagos (4/30)	Moderada degeneración hidrópica (20/30). Hiperplasia de túbulos con núcleos hipertróficos (21/30). Regeneración tubular (16/30).	Moderada degeneración hidrópica (25/30). Moderada presencia de hiperplasia de túbulos con núcleos hipertróficos (16/30). Presencia incrementada de melanomacrófagos (17/30)	Moderada degeneración hidrópica (27/30), severa necrosis tubular (30/30), fluido en espacio de Bowman y atrofia glomerular (25/30)

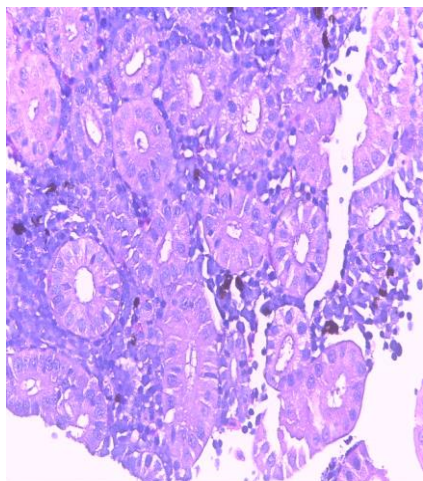


Foto 6.- Microfotografía de riñón de peces de grupo 1 (0.1% DMSO). Ligera regeneración tubular. HE, 40X

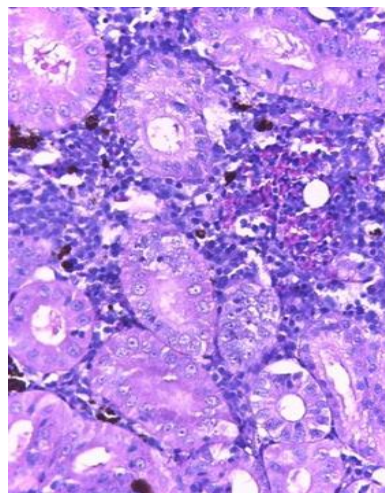


Foto 7.- Microfotografía de riñón de peces de grupo 2 (1% DMSO). Moderada degeneración hidrópica. Hiperplasia de túbulos con núcleos hipertróficos. Presencia melano-macrófagos. HE, 40X

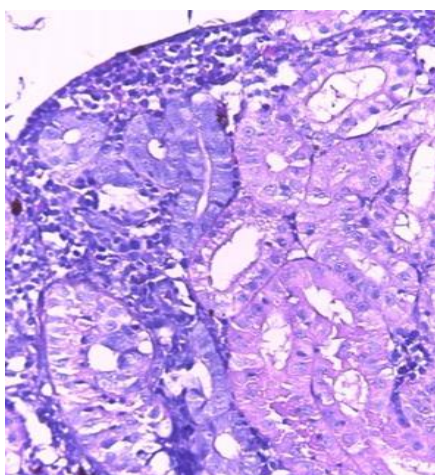


Foto 8.- Microfotografía de riñón de peces de grupo 3 (10% DMSO). Degeneración hidrópica. Hiperplasia de túbulos con núcleos hipertróficos. Regeneración tubular. HE, 40X

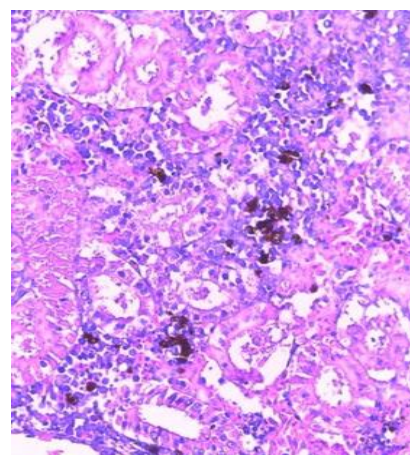


Foto 9.- Microfotografía de riñón de peces de grupo 4 (50% DMSO). Moderada presencia de hiperplasia de túbulos con núcleos hipertróficos. Presencia incrementada de melano-macrófagos Degeneración hidrópica. Regeneración tubular. HE, 40X

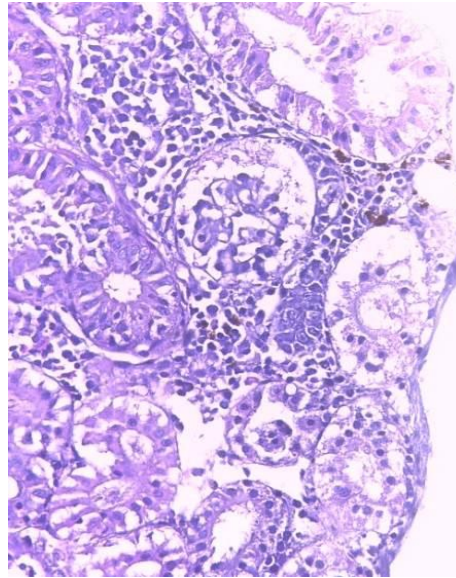


Foto 9.- Microfotografía de riñón de peces de grupo 5 (100% DMSO). Moderada degeneración hidrópica, severa necrosis tubular, fluido en espacio de Bowman y atrofia glomerular. HE, 40X

B.3.-Intestinos

En los peces tratados, los intestinos muestran diferentes grados de lesiones celulares y de tejidos los cuales se van incrementando en número y grados de lesiones como se describen en el cuadro 12 y en las microfotografías de intestinos procesados para láminas histológicas coloreadas con Hematoxilina-eosina.

En el cuadro 11 se observa los promedios en el score para hiperplasia de enterocitos y mucosa. En este cuadro se observa que no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos 0, 1 y 2, mientras que el grupo 4 y el grupo 5 fueron diferentes a todos los demás grupos incluso entre sí.

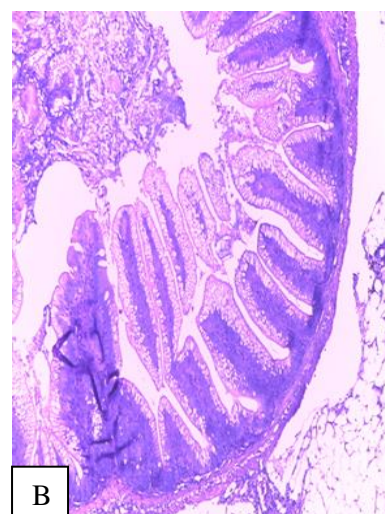
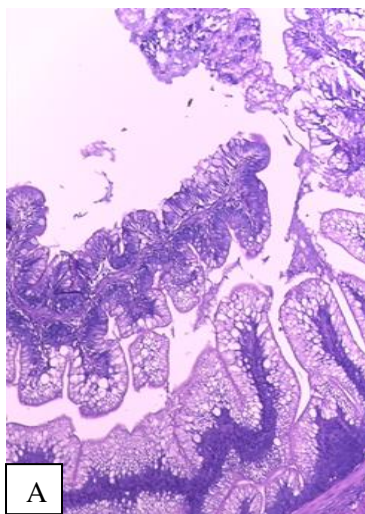
Cuadro 11.- Promedio (mediana) de scores para lesiones histológicas en riñón

Intestino	
Grupo	Hiperplasia
0	0(0) ^a
1	0(0) ^a
2	0.1(0) ^{ab}
3	0.33(0) ^b
4	1.13(2) ^c
5	2.5(3) ^d

a, ab, b, c, d Superíndices diferentes entre filas indican diferencia estadística significativa

Cuadro 12. Número de peces con lesiones histológicas en intestino de los grupos experimentales inoculados con distintas concentraciones de DMSO

G1= 0.1% DMSO N=30	G2= 1% DMSO N=30	G3= 10% DMSO N=30	G4= 50% DMSO N=30	G5= 100% DMSO N=30
No alteraciones celulares (30/30)	Hiperplasia de enterocitos y mucosa (3/30)	Hiperplasia de enterocitos y mucosa (10/30)	Moderada hiperplasia de enterocitos y mucosa (17/30)	Severa hiperplasia de enterocitos y mucosa (25/30)



Fotografía 10.- Intestino de trucha inoculada con 50% (A) y 100% (B) de DMSO. Se observa una moderada (A) y severa hiperplasia (B) del epitelio de las vellosidades intestinales. HE, 40X

6 DISCUSIÓN

El objetivo del trabajo fue determinar el grado de toxicidad aguda del DMSO en alevines de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando se inoculan intraperitonealmente distintas concentraciones de DMSO, principalmente determinando sus efectos fisiológicos por signos clínicos y de citotoxicidad por determinación de lesiones histológicas en hígado, riñón e intestinos. Por los signos clínicos, los peces inoculados se observan normales hasta una concentración de 50% de DMSO, lo cual determina que el DMSO es un producto seguro e inocuo a altas concentraciones, no siendo tóxico a dosis usualmente

utilizadas como solvente de compuestos hidrofóbicos (Szmant, 1975), ya que el DMSO se emplea como disolvente para muchos tipos de fármacos y, a menudo, se utiliza como vehículo de control de elección para estudios *in vitro* e *in vivo* (Li y Lo, 2012). El uso de este solvente es tan omnipresente que la concentración de DMSO utilizada a menudo no se informa en su contenido farmacológico sin ser evaluado su carácter toxico en el uso de los fármacos que lo contienen en bajas dosis.

La LD_{50} obtenida fue de 75% (v/v) con una concentración de 8.25g / kg de pez, siendo muy alta la tolerancia del DMSO en los alevines de truchas arco iris y es similar a la obtenida por Benville et al (1968) en truchas (*Salmo gairdneri*) y en salmones (*Oncorhynchus rshawytscha*) de 12 gramos de talla. Hodge y Sterner (1949) clasificaron las sustancias con una LD_{50} oral de 5-15 g por kilogramo de peso corporal como prácticamente no tóxicas y, cuando se administran por vía intraperitoneal, son relativamente inofensivas. Las LD_{50} de DMSO en el presente estudio variaron de 12 a 17 g / kg por vía intraperitoneal, lo que clasificaría al DMSO como relativamente inofensivo.

Se les realizó necropsias a la totalidad de los animales en estudio (180 truchas arco iris), y los resultados obtenidos nos demostraron que no hubieron lesiones severas sino hasta la exposición al DMSO al 100% (30 de los animales en estudio), es decir, en el grupo donde tuvimos mortalidad total, siendo las lesiones encontradas en los otros grupos, de leves a moderadas, además de reversibles como se menciona en el estudio de Lapemmbush en 1971; incluso con el trabajo de Omprakazam en el 2008, aunque su concentración máxima fuera del 2%, observaron sintomatología que se revirtió a las 24 horas, demostrando su baja toxicidad y su adaptación.

En el grupo 5 se observó signos clínicos previos a la muerte de cada espécimen, como oscurecimiento de la piel, abultamiento del abdomen por ascitis, y nado errático, este último evidencia alteración neurológica, esto fue descrito por Castro en 1995 y luego por Cavaletti en el 2000 en estudios donde expusieron a roedores al DMSO.

Las lesiones histológicas observadas en los hígados son cambios celulares leves como la degeneración hidrópica, que tiene un incremento en número y severidad dependiente de las concentraciones de DMSO y se observan en pequeño número de peces a bajas dosis. Este daño es reversible y pasajero por lo cual no se manifiesta en signos clínicos ni mortalidades. Esto es debido al metabolismo del DMSO en el hígado dentro del ciclo del azufre para la síntesis de proteínas siendo los principales metabolismos los dimetilsulfona y sulfuro de dimetilo (Kolb et al, 1967; Layman y Jacob, 1985). Las moléculas de azufre del DMSO son las evaluadas y se concentran en el hígado de ratas tratadas con DMSO a los distintos periodos de horas de ingresadas dependientes de su modo de aplicación (Rosembaum y Jacob,

1964), por eso se observan células afectadas aun en bajas dosis de 0.5 a 1.0% como también lo describen ser tóxico en cultivos celulares (Hanslick et al, 2009). Se ha indicado que cuatro horas después de DMSO_35S oral en ratas, el valor de la relación de dimetilsulfona (DMSO₂) fue del 6,5% del de DMSO en plasma, hígado, testículos, riñón, bazo, intestino delgado y corazón (Noel et al, 1975). Después de la administración dérmica de DMSO_35S a conejos, la relación DMSO₂ / DMSO fue del 11,6% en los testículos, el cerebro, el plasma, la bilis, el humor acuoso, el cristalino, el humor vítreo y la piel en el lugar de aplicación. Se encontró una proporción más alta en el hígado y los riñones. Después de la administración cutánea de DMSO_35S al hombre, el DMSO desapareció de la sangre en 30-48 horas. El suero DMSO₂ alcanzó valores máximos después de 36-72 horas y desapareció después de 312 horas (Hucker et al, 1966; David, 1972). Denko et al (1967) creen que el átomo de azufre en DMSO sigue las mismas vías metabólicas que el azufre orgánico. El azufre orgánico en la metionina y la cistina marcadas con 35S se metaboliza principalmente en los tejidos blandos y los músculos, y se utiliza principalmente para la síntesis de proteínas. En ratas, DMSO_35S también se concentra en los tejidos blandos, como el estómago, el bazo y el cerebro. Con respecto al metabolismo de los sulfuros, como el sulfuro de dimetilo, la oxidación in vivo tiene lugar a través de un intermedio de sulfóxido con oxidación adicional a sulfonas (Wong y Reinertson, 1984). La dimetilsulfona es aparentemente un metabolito normal, ya que se ha aislado de las glándulas suprarrenales y sangre de bovinos (Ruzicka et al, 1940), orina de monos Rhesus y humana (Layman y Jacob, 1985). Además, se ha encontrado sulfuro de dimetilo como componente natural en la leche de vaca como un metabolito de origen microbiano, de la flora microbiana intestinal (He X, Slupsky, 2014).

La presencia de hiperplasia canicular dependiente de la concentración de DMSO es un signo del grado de intoxicación del órgano. Este evento patológico ocurre en intoxicaciones medicamentosas y se cree que se deben a su capacidad de reacción de las células epiteliales a la irritación por los tóxicos (Lee y Kaplan, 2002) en este caso por los metabolitos del DMSO), aunque también se utiliza como antiinflamatorio sobre todo en problemas articulares porque regula de producción de citoquinas proinflamatorias (Elisia et al, 2016).

Las lesiones histológicas en el riñón concuerdan con la principal forma de excreción de los metabolitos del DMSO. Se ha determinado que, en ratas inyectadas por vías endovenosa, el 80% es excretado por vías urinarias (Hucker et al, 1966) y el 52% después de la inyección intraperitoneal. Sin embargo, Malinin et al (1969) recolectaron solo el 30% del DMSO radioactivo administrado por vía intraperitoneal a cobayas. En perros, la administración oral o intravenosa de DMSO dio como resultado una producción de orina del 50% de la dosis en 36 horas (Kolb et al, 1967). El examen de las recolecciones de orina de 24 horas después de inyecciones intraperitoneales de DMSO_35S a ratas

reveló una recuperación del 12,8% como dimetilsulfona (Hucker, 1966). Estos reportes indican que los peces igualmente tienen al aparato urinario como el principal sistema de eliminación de los metabolitos del DMSO, siendo también el riñón excretor el que más daño sufre con alta dosis de DMSO y que son los signos clínicos de ascitis por falla renal el único signo clínico visto en los peces intoxicados previo a su muerte (Hucker, 1967).

Los daños histológicos en los intestinos a la alta dosis de DMSO, indican que este sistema también es utilizado para la excreción de los metabolitos del DMSO, siendo La hiperplasia la lesión más características y similar a lo que ocurre en el epitelio de los canalículos biliares son una característica de intoxicación aguda; esto se cree a su capacidad mitótica y presencia de células troncales que son inducidas por la irritación de los metabolitos tóxicos en estos órganos. Se ha visto que después de la administración oral, la recuperación urinaria de DMSO fue del 50,8% y del 22% para DMSO (Kolb et al 1967) recuperaron el 80% de la dosis original de DMSO dentro de los 8 días posteriores a la administración intravenosa al hombre, pero solo el 50% durante un período de 10 a 15 días después de la aplicación cutánea. Estos trabajos notaron que el hombre excreta muy poco DMSO en las heces.

En bajas dosis de DMSO se ha observado degeneración hidrópica y algunos daños celulares en los órganos en estudio, esto se puede deber a que el DMSO interfiere con la estructura de los lípidos, lo que podría proporcionar una explicación alternativa para los efectos observados en el presente estudio alterando la permeabilidad de las membranas celulares tanto a nivel de la membrana celular como a nivel de las membranas de las mitocondrias (Yuan et al, 2014). Se ha medido los 3 parámetros mitocondriales (respiración basal, dependiente de ATP y FCCP) y disminuyeron en presencia de DMSO, esto implica que la función mitocondrial se altera directamente con la adición de DMSO. Se observó un aumento del calcio intracelular después de la aplicación de DMSO (Trubiani et al, 2003). La desregulación de las células de calcio se asocia con la muerte celular, especialmente en las células musculares y neuronales (Yuan et al, 2014). Mientras que el aumento del calcio intracelular conduce a la captación de Ca^{2+} mitocondrial, la regulación positiva del ciclo del TCA y el aumento de la fosforilación oxidativa, la sobrecarga de Ca^{2+} puede inducir la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) y la necrosis (Trubiani et al, 2003). Estos cambios patológicos de las membranas celulares están asociados también la apoptosis que induce el DMSO en altas concentraciones; in vitro, se informa que el DMSO induce la apoptosis en concentraciones del 10% (v / v), debido a la formación de poros en la membrana plasmática (Notman et al, 2006). Además, se ha informado anteriormente que el DMSO induce la muerte celular a través de la caspasa-9 en la línea celular EL-4 y la activación de la caspasa-3 tanto in vitro en una línea celular coclear como in vivo en el sistema nervioso central en desarrollo (Hanslick et al, 2009).

7 CONCLUSIONES

- El DMSO causa leves lesiones histopatológicas de daño celular en hígado, riñón e intestino en bajas dosis (hasta 50%), las cuales son no significativas y/o reversibles.
- A dosis de 100% causa severos daños celulares como necrosis e hiperplasias que se correlacionan con la sintomatología clínica de ascitis por daño renal.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Authier, N., Dupuis, E., Kwasiborski, A., Eschalier, A., Coudoré, F., 2002. Behavioural assessment of dimethylsulfoxide neurotoxicity in rats. *Toxicol. Lett.* 132, 117–121.
2. Aquino-Martinez G. 2008. Manual básico para el cultivo de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Enero 08. GEM TIES Cuencas Sanas y Modos de Vida Sustentable Series de Manuales de Capacitación Manual de capacitación para la participación comunitaria. Editor Por Guillermo Aquino Martínez. <https://issuu.com/lcamues/docs/manual-basico-para-el-cultivo-de-trucha-arco-iris->
3. Benville P., Smith Ch., Shanks W. 1968. Some Toxic Effects of Dimethyl Sulfoxide in Salmon and Trout. *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY* 12, 156-1 78.
4. Castro CA., Hogan JB., Benson KA., Shehata CW., Landauer MR., 1995. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50, 521–526.
5. Carolsfeld J., Godinho H. P., Zanibonifilho E., Harvey B.J. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology, Florida*, v. 63, n. 2, p. 472-489.
6. Cavaletti, G., Oggioni, N., Sala, F., Pezzoni, G., Cavalletti, E., Marmiroli, P., Petruccioli, M.G., Frattola, L., Tredici, G., 2000. Effect on the peripheral nervous system of systemically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study. *Toxicol. Lett.* 118, 103–107.
7. Chen TH., Wang YH., Wu YH. 2011. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquatic Toxicology* 102. 162–166.
8. David NA. The pharmacology of dimethyl sulfoxide. *Annu Rev Pharmacol.* 1972. 12:353-74
9. Denko CW., Goodman RM., Miller R., Donovan T. 1967. DISTRIBUTION OF DIMETHYL SULFOXIDE-35S IN THE RAT. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141: 77-84.

10. Elisia I, Nakamura H, Lam V, Hofs E, Cederberg R, Cait J, Hughes MR, Lee L, Jia W, Adomat HH, Guns ES, McNagny KM, Samudio I, Krystal G. 2016. DMSO Represses Inflammatory Cytokine Production from Human Blood Cells and Reduces Autoimmune Arthritis. *PLoS One*. Mar 31;11(3):e0152538.
11. Evans, M.S., Reid, K.H., Sharp Jr., J.B., 1993. Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neurosci. Lett.* 150, 145–148.
12. FAO. 2009. Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en
13. FAO. 2011. Base de Datos de Pesca y Acuicultura de la FAO. Fishtat Plus.
14. Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R., Cordeiro, M.F., 2014. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 28, 1317–1330.
15. Gaspar M, Bovaira M, Carrera-Hueso F, Querol M, Jimenez A, Moreno L. 2011. Efficacy of a topical treatment protocol with dimethyl sulfoxide 50% in type 1 complex regional pain syndrome. *Farm Hosp.* 36(5):385-91
16. Gaylord chemical company. 2014. DMSO, Bolletín 106. Disponible en: [GC-Literature-106.pdf \(gaylordchemical.com\)](http://www.gaylordchemical.com/GC-Literature-106.pdf)
17. Hanslick J., Lau K., Noguchi K., Olney J., Zorumski C., Mennerick S., Farber N. 2009. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol. Dis.* 34, 1–10
18. He X., Slupsky CM. 2014. Metabolic fingerprint of dimethyl sulfone (DMSO₂) in microbial-mammalian co-metabolism. *J Proteome Res.* Dec 5;13(12):5281-92
19. Huang Y., Cartlidge R., Walpitagama M., Kaslin J., Campana O., Wlodkowic D., 2018. Unsuitable use of DMSO for assessing behavioral endpoints in aquatic model species. *Science of the Total Environment* 615. 107–114

20. Hucker HB., Ahmad PM., Miller EA.. 1966. Absorption, distribution and metabolism of dimethylsulfoxide in the rat, rabbit and guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther.* 154(1):176-84.
21. Hucker HB., Miller JK., Hochberg A., Brobyn RD., Riordan FH., Calesnick B. 1967. Studies on the absorption, excretion and metabolism of dimethylsulfoxide (DMSO) in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 155(2):309-17.
22. Kais B., Schneider KE., Keiter S., Henn K., Ackermann C., Braunbeck T. 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic Toxicology* 140– 141. 229– 238.
23. Kolb K., Jaenicke G, Kramer M., Schulze, P. 1967. Absorption, distribution and elimination of labeled dimethyl sulfoxide in man and animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141, (1), 85-95
24. Kwak S., Lafleur M. 2009. Effect of dimethyl sulfoxide on the phase behavior of model stratum corneum lipid mixtures. *Chemistry and Physics of Lipids* 161. 11–21
25. Lapemmbush W., Willis L. 1971. Acute Toxicologic Effects of Dimethyl Sulfoxide on the Rough-Skinned Newt (*Taricha granulosa*). *Toxicology and applied pharmacology* 18, 141-150
26. Layman DL., Jacob SW. 1985. The absorption, metabolism and excretion of dimethyl sulfoxide by rhesus monkeys. *Life Sci.* 37:2431–2437.
27. Lee Y., Kaplan MM. 2002. Management of primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol.* 97: 528-34.
28. Leung KP. 1991. Principles of biological cryopreservation. In: Jamieson, B. G. M. (Ed.). *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 231-244.
29. Li Y., Lo AC. 2012. Lutein protects RGC-5 cells against hypoxia and oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2109–2117
30. Malinin G., Fontana D., Braungart D. 1969. Distribution of C14-labeled dimethyl sulfoxide in tissues of intact animals, *Cryobiology*, 5 (5): 328-335

31. Miliorini AB., Murgas DS., Rosa PV., Oberlender G., Pereir, JM., Costa DV. 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research*, Oxford, 42 (2):177-187.
32. Ministerio de La Producción (PRODUCE). 2011. Anuario Estadístico.
33. Ministerio de la Producción (PRODUCE). 2013. Anuario Estadístico.
34. Noel PRB., Barnett KC., Davies RE., Jolly DW., Leahy JS., Mawdesley-Thomas LE., Worden AN. 1975. The toxicity of dimethyl sulphoxide (DMSO) for the dog, pig, rat and rabbit. *Toxicology*, 3(2), 143–169.
35. Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J. 2006. Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes. *J. AM. CHEM. SOC.* 128, 13982-13983
36. Omprakasam M, Dayalan A, Ganesan M. 2008. Aquatic toxicity of dimethyl sulphoxide on the Indian Major Carp, *Catla catla* (Hamilton). *Indian Journal of Science and Technology*. Vol.1 No 4 (September).
37. Pagán OR., Rowlands AL., Urban KR., 2006. Toxicity and behavioral effects of dimethylsulfoxide in planaria. *Neurosci. Lett.* 407, 274–278.
38. Rosenbaum E, Jacob S. 1964. Dimethyl sulfoxide (dmsO) in musculoskeletal injuries and inflammations. II. Dimethyl sulfoxide in rheumatoid arthritis, degenerative arthritis and gouty arthritis. *Northwest Med.* Apr;63:227-9.
39. Ruzicka L, Goldberg MW, Meister H. 1940. Isolation of dimethylsulfone from bovine blood. *Acta Chimica Helvetica* 23:559–61
40. Sackerman J., Donegan JJ., Cunningham CS., Nguyen NN., Lawless K., Long A., Benno RH., Gould GG. 2010. Zebrafish behavior in novel environments: effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. *Int. J. Comp. Psychol.* 23, 43–61.

41. Smith GR, Stearley RF. 1989. The Classification and Scientific Names of Rainbow and Cutthroat Trout. *Fisheries* 1:4-10.
42. Suzuki T, Komada H, Takai R, Arai K, Kozima T. 1995. Relation between Toxicity of Cryoprotectant DMSO and Its Concentration in Several Fish Embryos. *Fisheries Science* 61(2), 193-197.
43. Szmant, HH. 1975. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 243, 20–23.
44. Trubiani O., Salvolini E., Staffolani R., Di Primio R., Mazzanti L. 2003. DMSO Modifies Structural And Functional Properties Of Rpmi-8402 Cells By Promoting Programmed Cell Death. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 16 (3):253-259.
45. Varela A., Fernandes E., Figueiredo T., Yokoyama E., Desessards R., Streit D., Dahl C. 2015. The role of dimethyl sulfoxide in the cryopreservation of Curimba (*Prochilodus lineatus*) semen. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 36, n. 5, p. 3471-3480.
46. Viveiro, TM., Orfao LH., Maria AN., Allaman IB. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science*. 112(3-4): 293-300.
47. Willford W. 1967. Toxicity of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) to Fish. United States Department of the Interior. Washington, D.C. April.
48. Wong, Linda K. and Reinertson, Eric L. 1984. "Clinical Considerations of Dimethyl Sulfoxide," *Iowa State University Veterinarian*: Vol. 46: Iss. 2, Article 2. Available at: https://lib.dr.iastate.edu/iowastate_veterinarian/vol46/iss2/2
49. Yuan C, Gao J, Guo J, et al. 2014. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PLoS One*. 9(9):e107447. doi:10.1371/journal.pone.0107447

